

注射用复方荭草中荭草不同工艺 提取物对大鼠心肌缺血的影响

刘志宝, 兰燕宇*, 王永林, 王爱民, 李勇军, 何 迅
(贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 经对不同纯化工艺制备的荭草提取物进行药效学比较研究, 确定合理可行的精制纯化工艺。方法: 采用结扎大鼠冠状动脉左前降支建立急性心肌缺血模型, 股静脉给药比较 D_{101} 大孔吸附树脂吸附分离与正丁醇萃取两种工艺的不同提取部位对急性心肌缺血大鼠心电图、心肌梗死范围、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)的影响。结果: 与大孔吸附树脂比较, 荭草的正丁醇提取物能更好地抑制急性心肌缺血大鼠心电图J点升高, 减小心肌梗死范围, 降低CK、LDH水平。结论: 荭草采用正丁醇提取能够将有效成分充分富集。

[关键词] 荭草; 急性心肌缺血; 大孔吸附树脂; 正丁醇

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)08-0021-04

Effects of Different Extracts of Hongcao from Fufang Hongcao on Acute Myocardial Infarction in Rats

LIU Zhi-bao, LAN Yan-yu*, WANG Yong-lin, WANG Ai-min, LI Yong-jun, HE Xun
(Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare Pharmacodynamics properties between the extracts of Hongcao, and determine an optimum technique to refine and purify. **Methods:** The acute myocardial infarction of rat was induced by ligating anterior branch of the left coronary artery. The change of ECG, and the level of CK, LDH were determined, the infarction area of myocardium was also observed. **Results:** N-butanol extracts of Hongcao could obviously decrease the elevated J of ECG, decrease the infarction area of myocardium, reduce the level of CK, LDH. **Conclusion:** Adopt n-butanol extraction can concentrate effective composition of Hongcao.

[Key words] Hongcao; myocardial ischemia; macroporous absorbing resin; n-butanol

注射用复方荭草(冻干粉针)是以荭草为君药, 采用现代制备工艺研制而成的中药注射用冻干粉针。具有化瘀通络, 活血止痛功能, 临床用于冠心病心绞痛心血瘀阻证。荭草为蓼科植物红蓼(*Polygonum orientale* L.)的全草, 具有祛风利湿, 活

血, 消积, 止痛的功效, 民间常用于治疗胸痹心痛^[1]。化学成分研究的结果表明本品主要含黄酮类和酚酸类化合物, 文献报道该类化合物为主要有效成分^[2-5]。本文通过荭草大孔吸附树脂与正丁醇提取物的药效学进行对比实验, 考察不同精制纯化工艺提取物对大鼠急性心肌缺血的影响^[8]。

1 材料

1.1 药品 荭草(*Polygonum orientale* L.) 产地: 贵州遵义、贵州省惠水县, 采收期: 8~9月。由贵阳医学院药物研究所生药学研究室龙庆德副教授鉴定。复方丹参注射液, 上海第一生化药业公司上海第一

[收稿日期] 2006-11-14

[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项基金项目(黔科合中药专字[2004]03号)

[通讯作者] * 兰燕宇, Tel: (0851) 6908899; E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

制药厂(批号 010511); 异荜草素和荜草素对照品是作者从荜草中分离、纯化而得, 经 NMR、MS 鉴定为异荜草素、荜草素(另文报道), HPLC 归一化法测定其纯度均在 98% 以上; 原儿茶酸和没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所)。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 60 只, 体重(180~210)g, 由贵阳医学院动物中心提供。合格证: SCXK(黔)2002-0001。

1.3 仪器与试剂 心电图仪, 日本 NIHON KOHDEN 公司; DH140 人工呼吸器, 浙江医科大学医学仪器实验厂; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒, 肌酸激酶(CK)试剂盒, 中生北控生物科技股份有限公司, 批号分别为 130021.090051; 硝基四氮唑蓝(NBT), Sigma 公司生产, 批号: 20011120。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 药材提取与分离 取荜草药材 600 g, 加水煎煮 3 次, 每次 1 h, 滤过, 滤液浓缩(2 g 生药·mL⁻¹), 加乙醇使含醇量达 65%, 静置 12 h, 回收乙醇, 浓缩至相对密度 1.05(50 °C), 冷藏 24 h, 滤过, 滤液上聚酰胺柱(50 g, 径高比=1:6, 吸附流速=0.5 BV·h⁻¹), 用 80% 乙醇洗脱(洗脱流速=1.5 BV·h⁻¹), 收集流穿液和乙醇洗脱液, 回收乙醇, 均分为 2 份。

2.1.2 D₁₀₁ 大孔吸附树脂吸附分离工艺 取上述提取物 1 份上 D₁₀₁ 树脂柱(300 g, 径高比=1:8, 吸附流速=0.5 BV·h⁻¹), 先用水洗(洗脱流速=0.5 BV·h⁻¹), 合并流穿液和水洗液为样品 A, 继用 70% 的乙醇解吸(解吸流速=1 BV·h⁻¹), 收集解吸液, 回收乙醇得样品 B。

2.1.3 正丁醇萃取工艺 另 1 份提取物用 1/2 倍量水饱和和正丁醇萃取 4 次, 萃取后的水溶液为样品 C, 正丁醇萃取液合并, 回收正丁醇得样品 D。

2.1.4 样品制备 上述样品, 水浴浓缩至 2 g 生药·mL⁻¹, 调 pH 值至 7.5, 滤过, 冷藏 24 h, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 分装, 灭菌, 备用。

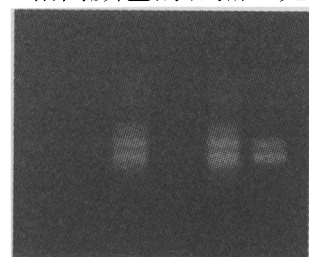
2.2 各提取物中指标成分的薄层检查

2.2.1 供试品溶液的制备 取样品 A~D 各 1 mL, 水浴挥至近干, 分别加甲醇 5 mL, 溶解, 超声处理 5 min, 离心, 取上清液作为供试品溶液。

2.2.2 荜草素和异荜草素的薄层检查 取荜草素、异荜草素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验^[9],

吸取样品 A~D 和对照品溶液各 2 μL, 分别条带状点于同一聚酰胺薄膜上, 以甲醇-水-冰醋酸(4:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 三氯化铝乙醇液, 置紫外光灯(365 nm)下检视, 结果样品 B、D 与荜草素和异荜草素对照品的相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点。见图 1。

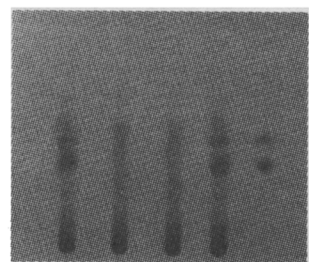
2.2.3 原儿茶酸和没食子酸的薄层检查 取原儿茶酸和没食子酸对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含原儿茶酸 0.5 mg 和含没食子酸 0.2 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验^[9], 吸取样 A~D 和对照品溶液各 2 μL, 分别点于同一硅胶 G 板上, 以氯仿-醋酸乙酯-甲酸(5:3:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 三氯化铁乙醇液, 加热至斑点显色清晰, 结果样品 A、D 与原儿茶酸和没食子酸对照品的相应位置上, 显相同颜色的斑点。见图 2。



A B C D 对照组

图 1 荜草素和异荜草素的 TLC 图

A. 树脂水洗液; B. 树脂醇洗液; C. 正丁醇水提液;
D. 正丁醇液; 对照品: 荜草素和异荜草素



A B C D 对照组

图 2 原儿茶酸和没食子酸 TLC 图

A. 树脂水洗液; B. 树脂醇洗液; C. 正丁醇水提液;
D. 正丁醇液; 对照品: 原儿茶酸和没食子酸

2.3 抗大鼠急性心肌缺血试验^[6,7]

2.3.1 心电图测定 取 SD 雄性大鼠 70 只, 随机分为 7 组, 即假手术组、模型组、阳性药组(复方丹参注射液, 剂量为 2 g 生药·mL⁻¹)、样品 A 组、B 组、C 组、D 组。试验前各组动物用 10% 乌拉坦 1.0 g·kg⁻¹ 腹腔麻醉, 固定于鼠板上, 记录正常心电图。打开胸腔前接上人工呼吸机, 除假手术组外, 各组动物结扎左冠状动脉前降支后, 迅速关闭胸腔, 恢复呼吸, 记录心电图, 有明显 J 段抬高者为手术成功征象(剔除未

出现明显心肌梗死心电图波形者)。结扎后 A~D 各组与阳性药组即刻分别股静脉给药 3 mL·kg⁻¹, 假手术组和模型组给予等体积生理盐水。记录结扎后 5, 15, 30, 60, 120 min 各时间点心电图, 计算各时间 J 点上下偏移 mv 数, 并进行统计处理。

2.3.2 血清 LDH, CK 含量测定 结扎 2 h 后, 腹主动脉取血, 3 500 r/min 离心, 分离血清, 生化仪器测定血清中乳酸脱氢酶(LDH) 肌酸激酶(CK) 的活力。

2.3.3 心肌梗塞范围测定 结扎 3 h 后, 处死大鼠, 立即取出心脏, 用生理盐水洗净余血, 剪去心房及各大血管、筋膜、心耳等, 称取心室重量, 然后将心肌切成等厚度的 5 片, 置于 37 °C 0.5% NBT 染色液中染

色 10 min, 取出剪去被染色的非梗塞心肌, 称重未染色的梗塞区心肌, 按下式计算心肌缺血区百分率, 进行统计处理。

$$\text{心肌缺血区百分比} = \frac{\text{缺血区重量}}{\text{心室重量}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 对大鼠急性心肌缺血心电图的影响 由表 1 可知, 样品 A、B、D 均能不同程度抑制急性心肌缺血大鼠 J 点升高, 与模型组比较有显著差异, 从作用趋势来看样品 D 作用比较明显(起效时间快, 维持时间长, 作用强度大)。

表 1 苈草不同工艺提取物对大鼠结扎左冠状动脉前降支后 ECG 的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 (g/kg) | n | 结扎前 J 点 (mv) | 结扎后 J 点(mv) | | | | |
|------|--------------|----|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|
| | | | | 5 min | 15 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| 假手术 | — | 10 | 0.08 ± 0.02 | 0.10 ± 0.04 | 0.11 ± 0.04 | 0.11 ± 0.04 | 0.09 ± 0.04 | 0.09 ± 0.03 |
| 模型组 | — | 9 | 0.41 ± 0.05 | 0.54 ± 0.07 | 0.58 ± 0.09 | 0.61 ± 0.09 | 0.64 ± 0.12 | 0.70 ± 0.12 |
| 阳性药组 | 6.0 | 9 | 0.40 ± 0.06 | 0.45 ± 0.06 ²⁾ | 0.48 ± 0.07 ¹⁾ | 0.51 ± 0.10 ¹⁾ | 0.53 ± 0.11 ¹⁾ | 0.61 ± 0.10 |
| 样品 A | 6.0 | 10 | 0.40 ± 0.05 | 0.45 ± 0.08 ¹⁾ | 0.45 ± 0.09 ¹⁾ | 0.52 ± 0.08 ¹⁾ | 0.53 ± 0.11 | 0.59 ± 0.12 |
| 样品 B | 6.0 | 9 | 0.42 ± 0.07 | 0.46 ± 0.09 ¹⁾ | 0.48 ± 0.10 ¹⁾ | 0.50 ± 0.10 ¹⁾ | 0.52 ± 0.12 ¹⁾ | 0.58 ± 0.14 |
| 样品 C | 6.0 | 9 | 0.40 ± 0.05 | 0.47 ± 0.08 ¹⁾ | 0.53 ± 0.10 | 0.57 ± 0.10 | 0.58 ± 0.17 | 0.64 ± 0.11 |
| 样品 D | 6.0 | 9 | 0.41 ± 0.05 | 0.45 ± 0.04 ²⁾ | 0.47 ± 0.07 ¹⁾ | 0.50 ± 0.08 ¹⁾ | 0.54 ± 0.06 ¹⁾ | 0.62 ± 0.09 |

注: 与模型组比较, ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。阳性药组: 复方丹参注射液(下同)。

3.2 对心肌缺血后酶学指标及梗塞范围的影响

由表 2 可知, 除样品 C 外, 其他各样品均能显著降低血清中 LDH 及 CK 活力, 使心肌缺血区的百分率降低, 对急性心肌梗死具有明显保护作用(P < 0.05, P < 0.01), 与模型组比较有显著差异。实验结果提示大部分药理活性成分转移到了正丁醇萃取液中。

表 2 苈草不同工艺提取物对大鼠结扎左冠状动脉后酶学指标及心脏梗塞范围的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 (g/kg) | n | LDH (U/L) | CK (U/L) | 梗塞区/心室 (%) |
|------|--------------|----|---------------|---------------------------|----------------------------|
| 假手术 | — | 10 | 2 278 ± 609 | 902 ± 267 | 0.00 ± 0.00 |
| 模型组 | — | 9 | 3 871 ± 1 089 | 1 646 ± 571 | 19.84 ± 7.72 |
| 阳性药组 | 6.0 | 9 | 3 193 ± 779 | 1 496 ± 635 | 10.16 ± 7.20 ¹⁾ |
| 样 A | 6.0 | 10 | 3 108 ± 1 037 | 1 028 ± 368 ¹⁾ | 10.75 ± 6.38 ¹⁾ |
| 样 B | 6.0 | 9 | 2 984 ± 827 | 1 002 ± 380 ¹⁾ | 10.88 ± 6.00 ¹⁾ |
| 样 C | 6.0 | 9 | 3 401 ± 895 | 1 630 ± 598 | 14.58 ± 10.23 |
| 样 D | 6.0 | 9 | 2 997 ± 849 | 1 038 ± 302 ¹⁾ | 9.45 ± 6.49 ²⁾ |

4 讨论

薄层检查结果表明, D₁₀₁ 大孔吸附树脂能有效富集黄酮类成分^[10] (苈草素和异苈草素等), 而对酚酸类成分(原儿茶酸和没食子酸等)的富集作用较差。小分子酚酸类物质上柱后易被水洗脱, 不易被树脂吸附, 是 D₁₀₁ 大孔吸附树脂对药效活性成分富集效果差的主要原因, 所以苈草不宜使用该技术进行精制纯化。正丁醇萃取工艺可将这两类成分有效富集。

药效学实验表明, D₁₀₁ 大孔吸附树脂的不同提取部位均有药理活性, 说明黄酮类成分和酚酸类成分均为苈草的有效成分(与文献报道相符), 有效成分未能完全富集; 正丁醇萃取部分的药理活性明显, 有效成分富集效果好, 故本品中的苈草应采用正丁醇萃取技术进行精制纯化。

苈草药材的提取物中含有大量鞣质, 鞣质为极性较大的水溶性杂质, 本实验采用聚酰胺柱除去鞣质, 效果较好。

[参考文献]

- [1] 贵州省卫生厅. 贵州省中药材质量标准[S]. 贵州: 贵州人民出版社, 1988. 65.
- [2] Uma Devi P, Ganasoundari A, Vrinda B, *et al.* Radiation protection by the ocimum flavonoids orientin and vicenin mechanisms of action[J]. *Radiat Res*, 2000, 154(4): 455-460.
- [3] 朱丹妮, 高山林, 卞云, 等. 丹参四倍体优良品系有效成分的含量测定及药理学试验[J]. *植物资源与环境学报*, 2001, 10(2): 7-10.
- [4] 付晓春, 王敏伟, 李少鹏, 等. 荳蔻苷对缺氧-复氧心肌细胞的保护作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(1): 45-48.
- [5] 李勇军, 何迅, 刘丽娜, 等. 荳蔻化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(6): 444-446.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 1994. 643. 655.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 672.
- [8] 陶玲, 沈祥春, 王永林, 等. 注射用复方荳蔻冻干粉针剂对兔离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(9): 1650-1652.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 2005. 附录 31.
- [10] 葛淑兰, 田景振. 大孔吸附树脂对淫羊藿总黄酮的分离纯化工艺研究[J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(5): 365-367.